

JAN ICIEK, ILONA BŁASZCZYK, AGNIESZKA PAPIEWSKA,
EDYTA CHMAL-FUDALI

INAKTYWACJA TERMICZNA SPOR *GEOBACILLUS* *STEAROTHERMOPHILUS* W PROCESIE STERYLIZACJI

Streszczenie

Celem pracy było porównanie i ocena różnych metod sterylizacji termicznej środowiska na podstawie inaktywacji obecnych w nim spor *Geobacillus stearothermophilus*.

Spory *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 10149 zawieszano w 5 % roztworze tryptonu oraz buforze cytrynianowym. Obróbkę cieplną wykonywano w kapilarach szklanych, uwzględniając warianty jedno- i dwuetapowe. W wariantcie jednoetapowym stosowano proces sterylizacji w temp. 125 °C. W wariantcie dwuetapowym dodatkowo wprowadzono wstępną obróbkę termiczną (115 °C przez 6 min), a następnie wykonywano sterylizację w 125 °C.

W jednoetapowym wariantcie badań wykazano, że przy wyższej temperaturze (125 °C) zastosowanie niskiego pH (4,0) środowiska poddawanego sterylizacji zawsze przyspiesza proces inaktywacji zawieszonych w nim przetrwalników, jednak może wystąpić ogonowanie na krzywych przeżycia co wymusza znaczne wydłużenie czasu sterylizacji. Na podstawie przebiegów inaktywacji spor w procesie sterylizacji realizowanej różnymi metodami wykazano, że zastosowanie wstępnej obróbki cieplnej zawsze eliminuje garb występujący w początkowym etapie na krzywej przeżycia. Przy czym w żadnym przypadku nie stwierdzono całkowitego wyeliminowania ogonowania, pojawiającego się na tych krzywych. Stwierdzono, że wprowadzenie wstępnej obróbki cieplnej przed głównym procesem sterylizacji nie jest korzystne, ponieważ nie powoduje ona odpowiedniego skrócenia czasu sterylizacji medium w 125 °C. Przeszkodą, która nie pozwala na znaczne skrócenie czasu sterylizacji są wyjątkowo ciepłooporne komórki obecne w populacji spor. Komórki te, aby przejść w stan zaktywowany, wymagają dłuższego czasu działania podwyższonej temperatury niż pozostałe spory obecne w populacji, nawet po zastosowaniu wstępnej obróbki cieplnej.

Słowa kluczowe: sterylizacja termiczna, *Geobacillus stearothermophilus*, inaktywacja przetrwalników

Wprowadzenie

Termiczne metody utrwalania żywności skutecznie niszczą mikroflorę w niej obecną i z tego powodu są najczęściej stosowane w praktyce przemysłowej. Przy czym obróbka cieplna produktów może powodować nadmierną degradację składników labilnych. Przyczyną nadmiernej degradacji składników żywności jest najczęściej zastosowanie zbyt ostrych warunków sterylizacji, w większości przypadków za długiego czasu sterylizacji. Z tego względu wciąż poszukuje się nowych rozwiązań technologicznych pozwalających na zmniejszenie niekorzystnych zmian zachodzących w środowisku podczas jego utrwalania.

Najbardziej odporne na niszczące działanie temperatury są przetrwalniki wytwarzane przez bakterie termofilne, do których należy *Geobacillus stearothermophilus*. Uważa się, że można je wykorzystywać jako wskaźniki biologiczne, pomocne przy ustalaniu optymalnych parametrów termicznej sterylizacji mediów [7].

Przetrwalniki *Geobacillus stearothermophilus* mogą występować w różnych stanach fizjologicznych, które określane są jako stan zaktywowany, uśpiony (spoczynkowy) i głęboko uśpiony. Shull i wsp. [11] stwierdzili, że cała populacja przetrwalników składa się zarówno z uśpionych, jak i zaktywowanych podpopulacji, oraz że tylko spory zaktywowane mogą ulegać destrukcji. Spory w stanie spoczynku (uśpione) generalnie nie stanowią zagrożenia dla jakości produktów żywnościowych, w których są obecne, o ile nie wykiełkują. Proces, w którym następuje przerwanie stanu uśpienia przetrwalnika i przeprowadzenie go w stan zaktywowany nazywany jest procesem aktywacji. Proces ten powoduje zwiększenie wrażliwości przetrwalników na czynniki letalne i jest potrzebny do zainicjowania ich kiełkowania i wzrostu. Aktywację spor przeprowadzano różnymi metodami: cieplnie, w równomolowym roztworze wapnia i kwasu dipikolinowego, stosując niskie pH, czynniki chemiczne np. alkohol etylowy, substancje redukujące np. merkaptolanol czy promieniowanie jonizujące [7]. Parametry wymagane do termicznego zaktywowania przetrwalników, tj. temperatura i czas jej działania uzależnione są nie tylko od rodzaju, ale również od gatunku bakterii. Niektóre przetrwalniki, np. wytwarzane przez *Bacillus megaterium* aktywują się w temp. 60 °C, natomiast wytwarzane przez *Geobacillus stearothermophilus* wymagają 115 °C [4].

Shull i Ernst [12] wykazali, że procesy cieplnej aktywacji przetrwalników *Geobacillus stearothermophilus* na skutek przetrzymywania ich w podwyższonej temperaturze, odpowiadają za wystąpienie garba/ramienia (ang. shoulder) na ich krzywych przeżycia. W populacji przetrwalników mogą występować również komórki skrajnie odporne na temperaturę, których stan fizjologiczny nazywany jest „głębokim” lub „super” uśpionym. Uznaje się, że opóźnienie czasu aktywacji wyjątkowo ciepłopornych osobników powoduje ogonowanie na krzywej przeżycia spor i wydłużenie czasu potrzebnego do uzyskania jałowego środowiska. Nieliniowy przebieg krzywych śmierci

cieplnej przetrwalników jest wynikiem obecności w ich populacji osobników o różnej wrażliwości cieplnej. Z badań własnych [3], jak i innych autorów [10] wiadomo, że w takim przypadku przebieg krzywych przeżycia zależy od początkowego stężenia przetrwalników będących w określonym stanie fizjologicznym (udziału spor zaktywowanych, uśpionych i „głęboko” uśpionych) oraz szybkości procesów aktywacji spor uśpionych i „głęboko” uśpionych, a także destrukcji spor zaktywowanych.

W literaturze przedmiotu istnieje rozbieżny pogląd odnośnie wpływu wystąpienia garba i ogonowania na krzywej przeżycia przetrwalników na parametry opisujące poziom ich ciepłooporności. Wielu autorów, mimo że wykazało wystąpienie takich etapów na krzywych śmierci cieplnej, nie uwzględnia ich w dalszej analizie procesu inaktywacji spor. Przykładowo Mazas i wsp. [6] wykazali, że na licznych krzywych śmierci cieplnej spor *Bacillus cereus* występował „garb” i „ogon”. Przy czym przy opracowywaniu wyników badań uwzględniano jedynie prostoliniowe odcinki krzywych przeżycia, z których wyznaczano wartości czasu dziesięciokrotnej redukcji. Lynch i Potter [5] rozpoczynali analizę przeżywalności cieplnej spor bakteryjnych po 150 s prowadzenia obróbki cieplnej w celu uniknięcia nieliniowego trendu krzywych śmierci. Tejedor i wsp. [13] przeprowadzali wcześniejszą aktywację cieplną badanej populacji spor, żeby wyeliminować garb w początkowym okresie krzywych przeżycia spor *Geobacillus stearothermophilus*. Niektórzy autorzy uznają nieliniowe przebiegi krzywych śmierci cieplnej spor bakteryjnych. Peleg [8] uważa, że przy wykreślaniu krzywych przeżycia niedopuszczalne jest pomijanie punktów eksperymentalnych. Podobnie Couvert i wsp. [1] twierdzą, że w przypadku nieliniowego przebiegu krzywej przeżycia spor, odczytywanie wartości D z odcinka przebiegającego według reakcji I rzędu do określenia ciepłooporności mikroorganizmów jest nieodpowiednie i obciążone dużym błędem.

Przyczyną pomijania zjawiska ogonowania przy opracowaniu wyników przez niektórych autorów jest prawdopodobnie niski poziom stężenia przetrwalników, przy którym jest ono często obserwowane. Uważa się, że zjawisko ogonowania występuje na granicy błędów oznaczeń i dlatego nie bierze się go pod uwagę w dalszym opracowaniu wyników badań. Według autorów tej publikacji zjawisko ogonowania nie może być lekceważone, ponieważ nawet małe stężenie przetrwalników pozostałych przy życiu w produkcie po obróbce cieplnej może stanowić zagrożenie dla jego jakości.

Wyniki analiz przebiegu krzywych przeżycia ciepłoopornych spor w zależności od różnych warunków obróbki cieplnej są przydatne przy poszukiwaniu możliwości ich złagodzenia. Wyeliminowanie zjawiska ogonowania na krzywych przeżycia pozwoliłoby na skrócenie czasu sterylizacji środowisk, a tym samym na uzyskanie jałowych środowisk lepszej jakości.

Proces aktywowania przetrwalników (przeprowadzanie ich w stan zaktywowany) przez zastosowanie podwyższonej temperatury przed głównym procesem sterylizacji stosowało wielu autorów [np. 13, 14]. W ten sposób eliminowano garb występujący w początkowym okresie krzywej śmierci cieplnej spor. Przy czym w literaturze brak jest informacji dotyczących wpływu aktywowania termicznego przetrwalników na przebieg ich inaktywacji w procesie sterylizacji termicznej, szczególnie na eliminację zjawiska ogonowania na krzywej przeżycia spor.

Celem pracy było porównanie różnych metod wyjaławiania środowiska, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu zakwaszania środowiska oraz zastosowania dodatkowej obróbki cieplnej na przebieg destrukcji spor *Geobacillus stearothermophilus*.

Material i metody badań

Materiałem biologicznym stosowanym w badaniach był szczep *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 10149 z American Type Culture Collection. Metodę otrzymywania przetrwalników opisano w publikacji [2].

W celu przeprowadzenia analizy przeżywalności przetrwalników badanego szczepu zawieszano je w 5 % roztworze tryptonu lub buforze cytrynianowym. Tego typu środowiska są często wykorzystywane jako roztwory modelowe w badaniach dotyczących ciepłooporności mikroorganizmów. Stosowano roztwór tryptonu o jego naturalnej wartości pH 7,1 oraz obniżanej do 4,0 kwasem cytrynowym. Przeżywalność spor *Geobacillus stearothermophilus* analizowano zawieszając je w buforze cytrynianowym o pH 4,0 i 5,0. W niektórych przypadkach zastosowano dodatek NaCl.

Eksperymenty prowadzono w kapilarach szklanych (średnica zewnętrzna 1,4 mm, średnica wewnętrzna 0,8 mm, długość 200 mm). Po napełnieniu kapilary analizowaną zawiesiną oba jej końce zatapiano w płomieniu palnika. Obróbkę cieplną prowadzono w wariacie jedno- i dwuetapowym. W pierwszym stosowano jedynie proces sterylizacji w temp. 125 °C. W drugim dodatkowo przed właściwą sterylizacją stosowano wstępną obróbkę termiczną (115 °C przez 6 min).

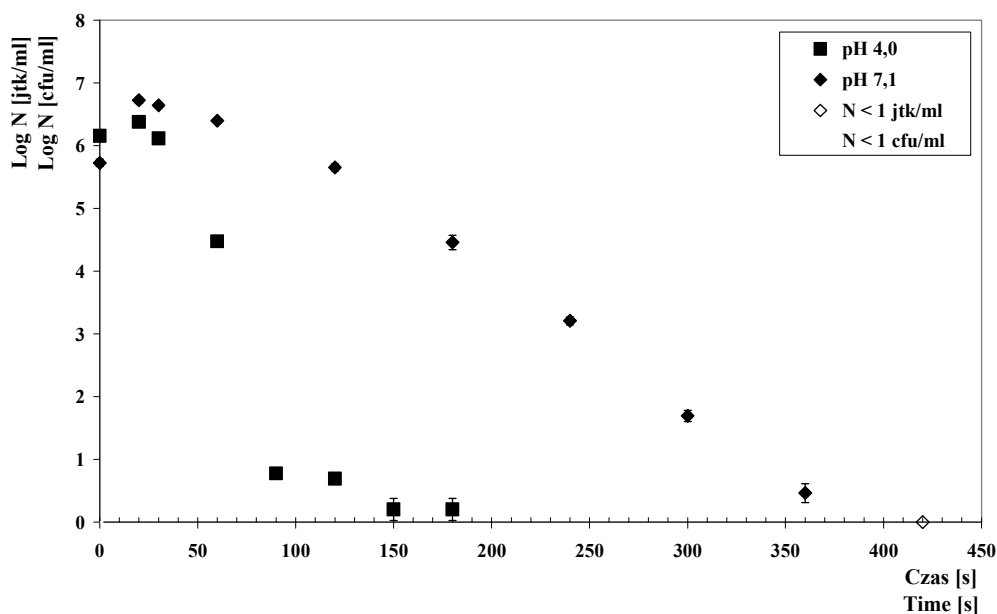
Liczbę przeżywających komórek (N) określano za pomocą metody płytkowej na podłożu regeneracyjnym [3], wykonując od 4 do 6 powtórzeń dla każdego czasu ogrzewania. Płytki inkubowano w temp. 55 °C przez 48 h.

Wyniki analiz przedstawiono na rysunkach w skali półlogarytmicznej jako zależność liczby komórek (N) od czasu prowadzenia obróbki cieplnej.

Wyniki i dyskusja

W wyniku sterylizacji wykonanej metodą jednoetapową, w zakresie temperatury 115 – 125 °C wykazano, że wystąpienie zjawiska ogonowania na krzywej śmierci ciepłej spor jest najczęstsze w trakcie procesu sterylizacji prowadzonego w wysokiej tem-

peraturze (125 °C) i przy obniżonej wartości pH środowiska. Przy czym Mwangi [7] nie wykazała obecności zjawiska ogonowania na krzywych śmierci cieplnej spor *Geobacillus stearothermophilus*, pomimo że zastosowała temperaturę 150 °C. Autorka prowadziła eksperymenty, zawieszając przetrwalniki w wodzie peptonowej, której wartość pH bliska jest obojętnej. W badaniach własnych również wykazano, że zastosowanie wyższej temperatury sterylizacji i obojętnego odczynu wyjąłwanego środowiska eliminuje ogonowanie na krzywej przeżycia przetrwalników (rys. 1 „♦”).



Rys. 1. Krzywe przeżycia spor *Geobacillus stearothermophilus* w jednoetapowej metodzie sterylizacji.
 Fig. 1. Survival curves of *Geobacillus stearothermophilus* spores under one-stage method of sterilization.

W literaturze przedmiotu nie określono jednoznacznie zakresu stężenia przetrwalników przeżywających w procesie sterylizacji, które powodują ogonowanie na ich krzywej przeżycia. Stężenia przetrwalników zdolnych do kiełkowania i wzrostu, uzyskane w końcowym okresie prowadzenia procesu sterylizacji, często kształtują się na bardzo niskim poziomie. W przypadku spor wytwarzanych przez *Geobacillus stearothermophilus* mogą to być wartości na poziomie kilku lub kilkunastu kolonii w jednym mililitrze środowiska poddanego obróbce cieplnej. Przeżywalność spor w końcowym etapie prowadzenia procesu sterylizacji oznaczana jest metodą wysiewów bezpośrednich, w związku z czym unika się błędu rozcieńczania próby. Tak uzyskane wyniki dowodzą, że jeśli zjawisko ogonowania na krzywych przeżycia spor występuje, to

najczęściej przy bardzo małych ich stężeniach w środowisku i nie jest to błąd oznaczenia.

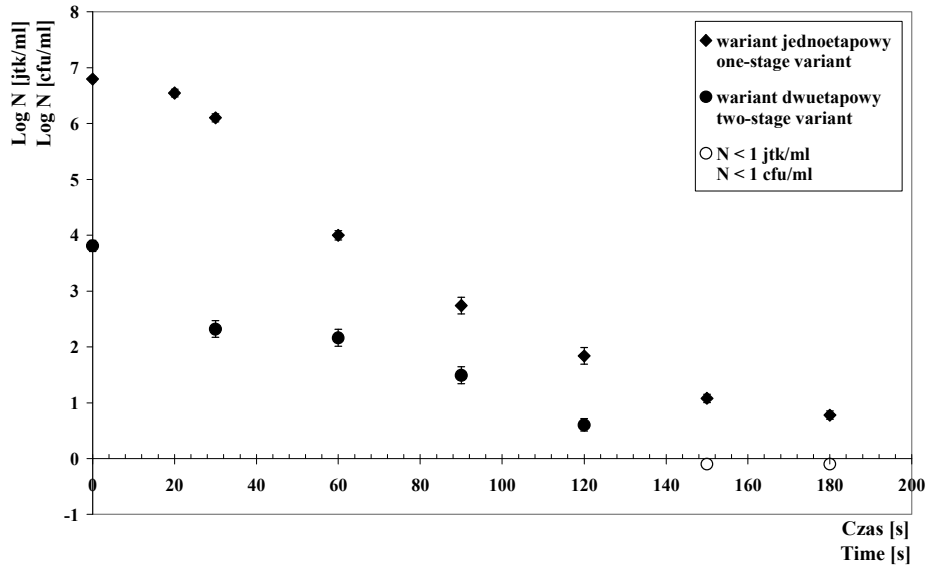
Na rys. 1. przedstawiono krzywe przeżycia przetrwalników zawieszonych w środowisku modelowym, tj. roztworze tryptonu o wartości pH 7,1 i 4,0. Obniżenie pH środowiska do 4,0 kwasem cytrynowym powodowało skrócenie całkowitego czasu procesu inaktywacji spor. Przy czym można przypuszczać, że w tym przypadku istnieje możliwość dodatkowego skrócenia czasu obróbki termicznej środowiska na skutek wyeliminowania zjawiska ogonowania pojawiającego się na krzywej przeżycia spor. Wystąpienie garba w początkowym etapie krzywych przeżycia spor *Geobacillus stearothermophilus* (rys. 1) tłumaczy się przewagą procesów aktywacji spor uśpionych nad procesami destrukcji spor zaktywowanych lub równowagą między tymi procesami.

W celu eliminacji zjawiska ogonowania na krzywej przeżycia spor zawieszanych w środowisku o wartości pH 4,0 i 5,0 wprowadzono dwuetapową metodę sterylizacji. Dodatkowa obróbka termiczna, zastosowana bezpośrednio przed właściwym procesem sterylizacji, miała na celu aktywację spor uśpionych i „głęboko” uśpionych. Parametry procesu aktywowania przetrwalników (temperaturę i czas jej działania) ustalono na podstawie własnych danych doświadczalnych oraz danych literaturowych. Tejedor i wsp. [13] oraz Wandling i wsp. [14] aktywowali przetrwalniki przez 15 min w temp. 100 °C, Wescott wsp. [15] w 105 °C również przez 15 min, Rodrigo i wsp. [9] zastosowali taki sam czas, ale wyższą temperaturę 110 °C.

Na rys. 2 - 5 wykreślono w skali półlogarytmicznej krzywe przeżycia spor *Geobacillus stearothermophilus* przetrzymywanych w temp. 125 °C, w różnych środowiskach, zarówno populacji spor poddanej, jak i niepoddanej wcześniejszemu ogrzewaniu w temp. 115 °C przez 6 min.

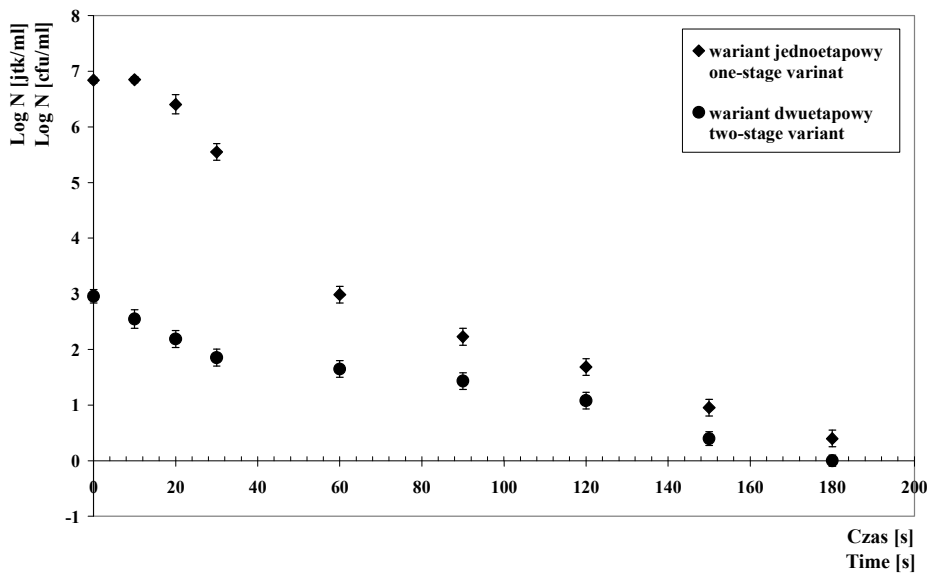
Czas sterylizacji w temp. 125 °C wymagany do wysterylizowania środowiska (bufor cytrynianowy o pH 4,0 i pH 5,0 a także o pH 5,0 z dodatkiem 1 % NaCl) w wariacie dwuetapowym był krótszy o 30 - 40 % w stosunku do czasu sterylizacji prowadzonej według wariantu jednoetapowego (rys. 2, 4, 5). Przy czym skrócenie czasu sterylizacji w temp. 125 °C w wariacie dwuetapowym powinno być znacznie większe, aby było to rozwiązanie korzystne, pozwalające na uzyskanie lepszej jakości środowiska.

W przypadku przetrwalników zawieszonych w buforze cytrynianowym o pH 4,0 z dodatkiem 1 % NaCl ich stężenie po wcześniejszej obróbce cieplnej zmniejszyło się aż o cztery jednostki logarytmiczne (rys. 3 „●”). Pomimo tak niskiego początkowego stężenia przetrwalników czas inaktywacji całej populacji w temp. w 125 °C, w wariacie dwuetapowym, był porównywalny z czasem sterylizacji w eksperymencie jednoetapowym. W przeprowadzonych badaniach potwierdzono, że wykonanie sterylizacji w sposób dwuetapowy eliminuje garb na krzywych przeżycia spor. Przy czym w żadnym przypadku nie zaobserwowano całkowitego wyeliminowania zjawiska ogonowania.



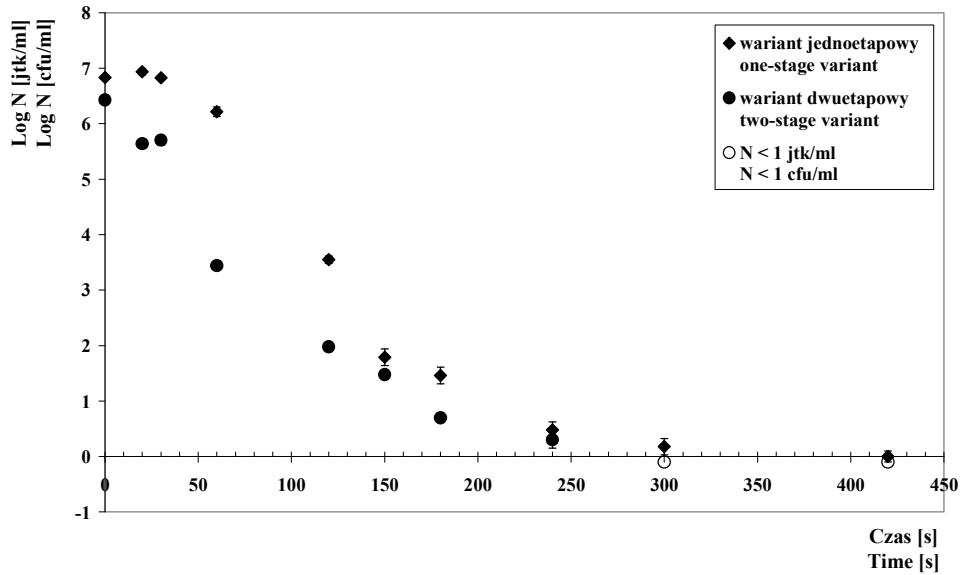
Rys. 2. Krzywe przeżycia spor *Geobacillus stearothermophilus* przetrzymywanych w temp. 125 °C w buforze cytrynianowym o pH 4,0.

Fig. 2. Survival curves of *Geobacillus stearothermophilus* spores kept at 125 °C in citrate buffer of pH 4.0.



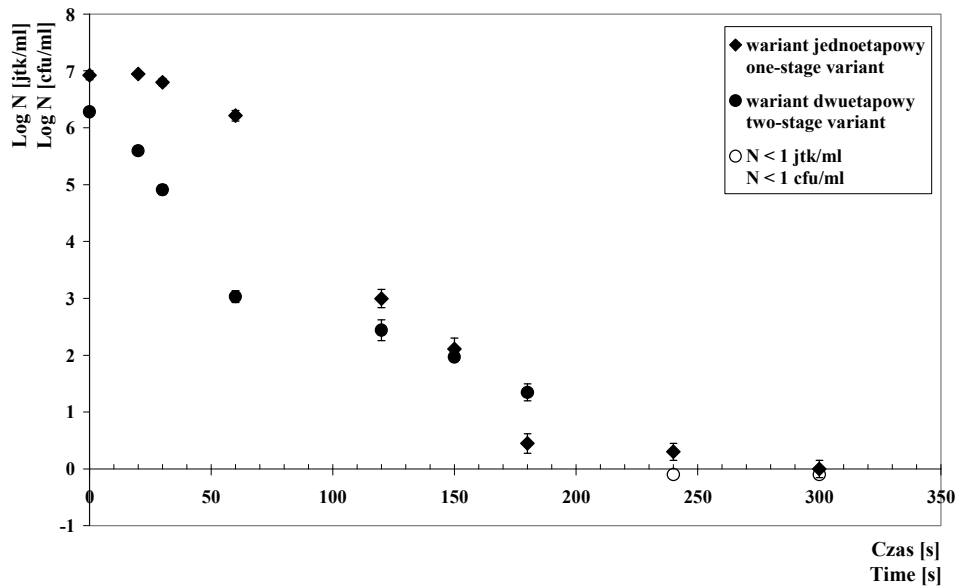
Rys. 3. Krzywe przeżycia spor *Geobacillus stearothermophilus* przetrzymywanych w temp. 125 °C w buforze cytrynianowym pH 4,0 z udziałem NaCl (1 g/100 ml).

Fig. 3. Survival curves of *Geobacillus stearothermophilus* spores kept at 125 °C in a citrate buffer of pH 4.0 with NaCl (1 g/100 ml).



Rys. 4. Krzywe przeżycia spor *Geobacillus stearothermophilus* przetrzymywanych w temp. 125 °C w buforze cytrynianowym o pH 5,0.

Fig. 4. Survival curves of *Geobacillus stearothermophilus* spores kept at 125 °C in citrate buffer of pH 5.0.



Rys. 5. Krzywe przeżycia spor *Geobacillus stearothermophilus* przetrzymywanych w temp. 125 °C w buforze cytrynianowym o pH 5,0 z udziałem NaCl (1 g/100 ml).

Fig. 5. Survival curves of *Geobacillus stearothermophilus* spores kept at 125 °C in citrate buffer of pH 5.0 with NaCl (1 g/100 ml).

Wyniki otrzymane w dwuetapowym wariacie sterylizacji świadczą o obecności w populacji spor wyjątkowo ciepłoopornych osobników. Komórki te wymagają stosunkowo długiego czasu działania podwyższonej temperatury, aby przejść w stan zaktywowany. Aktywacji tych spor nie przyspiesza niskie pH środowiska, ani obecność w nim chlorku sodu.

Wnioski

1. W jednoetapowym wariacie eksperymentu, przy wyższej temperaturze (125 °C), zastosowanie niskiego pH (4,0) środowiska poddawanego sterylizacji przyspiesza proces inaktywacji zawieszonych w nim przetrwalników, jednak może wystąpić ogonowanie na krzywych przeżycia.
2. Wprowadzenie dodatkowej obróbki cieplnej środowiska bezpośrednio przed główną sterylizacją eliminuje garb występujący na krzywych przeżycia, jednak nie pozwala na całkowite wyeliminowanie zjawiska ogonowania.
3. Skrócenie czasu sterylizacji w temp. 125 °C, w dwuetapowej metodzie sterylizacji, w odniesieniu do metody jednoetapowej, nie jest wystarczające, aby uznać tę metodę za korzystną dla jakości środowiska. Sumaryczna dawka ciepła dostarczona do środowiska w trakcie wstępnej obróbki cieplnej oraz procesu sterylizacji powoduje obniżenie jakości środowiska.
4. Skład badanego środowiska ma duży wpływ na kinetykę aktywacji termicznej spor uśpionych oraz możliwości skrócenia czasu sterylizacji (w 125 °C).
5. Wykazano, że najbardziej ciepłooporne spory obecne w populacji, nawet po zastosowaniu dodatkowej obróbki cieplnej, bardzo wolno przechodzą w stan zaktywowany.

Literatura

- [1] Couvert O., Gaillard S., Savy N., Mafart P., Leguérinel, I.: Survival curves of heated bacterial spores: effect of environmental factors on Weibull parameters. *Int. J. Food Microbiol.*, 2005, **101**, 73-81.
- [2] Iciek J., Błaszczuk I., Papiewska A.: The effect of organic acid type on thermal inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores. *J. Food Eng.*, 2008, **87**, 16-20.
- [3] Iciek J., Papiewska A., Molska M.: Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores during thermal processing. *J. Food Eng.*, 2006, **77**, 406-410.
- [4] Keynan A., Evenchik Z.: Activation. In: *The bacterial spore 1* - Edited by G.W. Gould., A. Hurst. Academic Press, New York 1969, pp. 359-396.
- [5] Lynch D. J., Potter N.N.: Effects of organic acids on thermal inactivation of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus coagulans* spores in frankfurter emulsion slurry. *J. Food Prot.*, 1988, **51 (6)**, 475-480.
- [6] Mazas M., López M., González I., González J., Bernardo A., Martín R.: Effects of the heating medium pH on heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *J. Food Safety*, 1998, **18**, 25-36.

- [7] Mwangi R.: Inactivation of wild-type bacillus spores in a soy meat analog model by extrusion cooking. Thesis supervisors, 2008, <https://mospace.umsystem.edu/xmlui/bitstream/handle/10355/5763/research.pdf?sequence=3>
- [8] Peleg M.: It's time to revise thermal processing theories. *Food Technol.*, 2006, **60**, 92.
- [9] Rodrigo F., Rodrigo C., Fernández P.S., Rodrigo M., Martínez A.: Effect of acidification and oil on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores heated in food substrate. *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, **52**, 197-201.
- [10] Sapru V., Smerage G.H., Teixeira A.A., Lindsay J.A.: Comparison of predictive models for bacterial spore population resources to sterilization temperatures. *J. Food Sci.*, 1993, **58** (1), 223-228.
- [11] Shull J.J., Cargo G.T., Ernst R.R.: Kinetics of heat activation and thermal death of bacterial spores. *Appl. Microbiol.*, 1963, **11**, 485-487.
- [12] Shull J.J., Ernst R.R.: Graphical procedure for comparing death of *Bacillus stearothermophilus* spores in saturated and superheated steam. *Appl. Microbiol.*, 1963, **10**, 452-457.
- [13] Tejedor W., Rodrigo M., Martínez A.: Modeling the combined effect of pH and temperature on the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores heated in multicomponent food extract. *J. Food Prot.*, 2001, **64** (10), 1631-1635.
- [14] Wandling L.R., Sheldon B.W., Foegeding P.M.: Nisin in milk sensitizes *Bacillus spores* to heat and prevents recovery of survivors. *J. Food Prot.*, 1999, **62** (5), 492-498.
- [15] Wescott G.G., Fairchild T.M., Foegeding P.M.: *Bacillus cereus* and *Bacillus stearothermophilus* spore inactivation in batch and continuous flow systems. *J. Food Sci.*, 1995, **60** (3), 446-450.

THERMAL INACTIVATION OF *GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* SPORES UNDER STERILIZATION PROCESS

S u m m a r y

The objective of this study was to compare and assess various thermal sterilization methods of environment based on the inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores present therein.

Geobacillus stearothermophilus ATCC 10149 spores were suspended in an water tryptone solution (5 g / 100 mL) and in a citrate buffer. The spores studied were thermally treated in glass capillary tubes; two variants of this thermal treatment were considered: one-stage and two-stage variants. Under the one-stage variant, a sterilization process was applied at 125⁰ C. Under the two-stage variant, a preliminary thermal treatment (115 °C for 6 minutes) was added and preceded the sterilization process at 125 °C.

During the one-stage variant of the research project, it was proven that at a higher temperature (125 °C), the application of low pH (4.0) of the medium under sterilization always accelerated the inactivation process of the spores suspended therein; however, a survival curve tailing might occur, thus, forcing the considerable extension of the duration time of sterilization.

Based on the progressing of spore inactivation processes during the sterilization carried out using different methods, it was shown that the use of the preliminary thermal treatment always eliminated a shoulder occurring on the survival curve at the initial stage of the process. Then again, no event was reported where the tailing appearing on those survival curves was fully eliminated. It was found that the introduction of a preliminary thermal treatment prior to the main sterilization process was not beneficial since it did not cause the duration time of sterilizing medium at 125⁰C to be reduced. An obstacle to hinder any significant sterilization time reduction are the extraordinarily heat-resistant cells present in the population of spores. Even after the application of preliminary thermal treatment, a higher temperature should be applied for a longer time in order to activate those cells compared to other spores present in the population.

Key words: thermal sterilization, *Geobacillus stearothermophilus*, inactivation of spores 